

# 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

山梨大学 山梨 GLIA センター  
特任助教 坂井 謙斗

## 1 研究テーマ

ミクログリア由来の細胞外小胞によるアレルギー性皮膚炎に対する制御機構の解析

## 2 研究の背景・目的

脳-腸相関に代表されるように、脳と末梢臓器間の積極的な情報のやりとりが生体機能に与える重要性が注目されている。この脳-末梢臓器連関のインターフェースとして、ミクログリアに注目が集まっている。ミクログリアは脳内免疫細胞として、脳内環境変化を鋭敏に感知し応答することで、脳の恒常性維持において重要な役割を果たしている。近年、末梢の炎症等の脳外環境の変化をも感知することが明らかとなり、ミクログリアは末梢臓器の監視及び制御においても重要な役割を有すると考えられるようになってきている。しかし、その実態はほとんどわかっていない。

これまで脳-末梢連関研究は、迷走神経等の神経系を介した情報伝達を中心に展開されてきた。しかし最近、細胞外小胞 (EV) が注目を集めている。EV は主にその大きさや形成過程の違いによりいくつかの種類に分類されているが、その中でもエクソソーム (粒子径:100 nm 未満) 及びマイクロベシクル (MV、粒子径:100 nm-1  $\mu$ m) は、小胞内に核酸・タンパク・脂質などの情報を含み、脳内及び末梢臓器間の情報伝達を担う (Wang D, Biomed Pharmacother, 2023)。多くの細胞が EV を産生し、ミクログリアも脳内 EV 産生細胞として注目され、実際ミクログリア由来の EV により脳の生理及び病態機能が制御されることが報告されている (Paolicelli R, Neuroscience, 2019、Gabrielli M, Brain, 2022)。

申請者は、現在、脳機能制御におけるミクログリアの役割を研究している。そして最近、ミクログリアが末梢臓器の炎症を感知し、MV を血中に放出することを見出した。具体的には、ミクログリアを可視化できる Iba1-GFP 及び CX3CR1-GFP マウスに、リポポリサッカライド (LPS) を投与して全身性の急性炎症を惹起した際に、ミクログリア由来の GFP 陽性 MV (約 1  $\mu$ m 弱の小胞) が脳血管内に放出されることを *in vivo* でイメージングすることに成功した (3 研究の成果-図 3 参照)。さらに、接触性皮膚炎モデルマウスにおいても、同様の GFP 陽性 MV が脳血管中で認められた (3 研究の成果-図 6

参照)。そこで本研究では、特に接触性皮膚炎モデルに注目し、ミクログリア由来 MV を介した皮膚炎の制御機構を明らかにすることで、「脳-皮膚相関」の実態解明を計画するに至った。本研究では、「①脳はミク

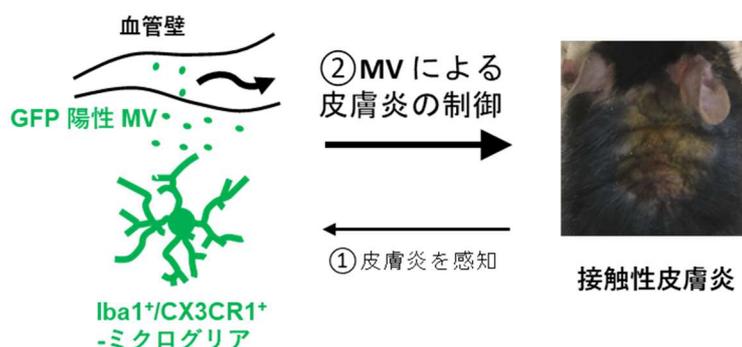


図 1. ミクログリア由来 MV による皮膚炎の制御機構の解明

ログリアを介して皮膚炎症を感知し、②MV を血中に放出することで皮膚炎症を制御している (図 1)」との仮説をたて、本研究では特に②に着目し、分子メカニズムとともにその検証を行う。

本研究の目的は、脳-末梢臓器連関の中核となるインターフェースにミクログリアを位置づけ、ミクログリア由来 MV を介した「脳 - 皮膚相関」の存在及びその実態を、特に接触性皮膚炎に注目して明らかにすること、である。末梢炎症が脳機能に影響を与えることは数多く報告されているが、その実態には不明な点が多い。申請者は前所属グループにて、難治性の痒みを伴う皮膚炎症が鬱などの脳疾患のリスクになることを報告している (Sanders KM, *Neurosci Biobehav Rev*, 2018、Sanders KM, Sakai K, *J Neurosci*. 2019)。しかし、皮膚疾患→脳疾患に至る分子メカニズムは不明な点が多い。さらに、脳→皮膚疾患に至る分子メカニズムに関してはほとんど手付かずの状態である。申請者は、ミクログリアが皮膚炎症を感知して、MV を放出することを既に見出している。従ってミクログリアがこの「脳 - 皮膚相関」のインターフェースとして中心的な役割を果たしている可能性が高い。つまり「脳内」および「血中」への MV の放出により、それぞれ脳機能及び皮膚疾患に影響を与える可能性がある (図 1)。難治性の皮膚炎は、患者の精神状態に影響し、またそれが疾患の予後にも大きく影響を与える。しかし、多くは十分な治療が行われているとは言えない状況である。従って本研究により、脳がミクログリアを介して皮膚疾患に影響を与える、という全く新たな皮膚疾患メカニズムの解明、さらには、ミクログリア由来 MV を新たな皮膚疾患の治療標的の提案が期待できる。

### 3 研究の方法

・ *in vivo* イメージングによるミクログリア由来の GFP 陽性 MV の検出

脳頭頂部の *in vivo* イメージングを行うことで、脳血管中における GFP 陽性 MV の検出を行った。具体的には、ミクログリアを可視化できる Iba1-GFP もしくは CX3CR1-GFP マウスの頭蓋骨に cranial window を作製後、

2 光子顕微鏡を用いて脳表付近における脳血管の *in vivo* イメージングを行った (図 2)。本イメージング法を、下記の末梢炎症モデルや細胞除去条件下で行った。

末梢炎症は、急性炎症モデル及び皮膚炎モデルマウスを用いた。具体的には、急性炎症モデルとして、グラム陰性菌の外皮成分 LPS を腹腔内投与することで末梢炎症を引き起こした後、脳表血管内の GFP 陽性 MV を経日的に観察した。皮膚炎モデルのうち、乾癬および接触性皮膚炎モデルにおいて脊髄に局在するミクログリアが活性化することが報告されている (Xu Z, *Molecular Pain*, 2020、Zhang Y, *Cell Physiol Biochem*, 2015)。そこで、イミキモド誘導性乾癬マウスモデル (Sakai K, *Pain*, 2016) および 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 誘導性接触性皮膚炎マウスモデルにおいて、脳表血管内の GFP 陽性 MV を経日的に観察した。

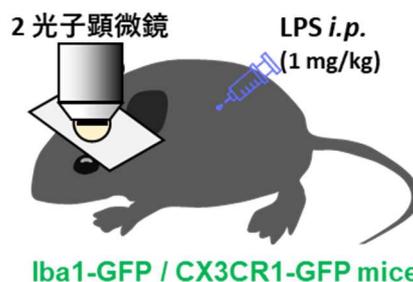


図 2. *In vivo* イメージング

Iba1 および CX3CR1 はミクログリアに高発現しその選択的なマーカーとして用いられているが、Iba1 は一部の単球・マクロファージ、もしくは好中球に、CX3CR1 は一部の末梢組織マクロファージに発現していることが報告されている。*in vivo* イメージングにより検出された GFP 陽性 MV がミクログリア由来かを検討するため、薬剤を用いたミクログリア、マクロファージもしくは好中球除去を行った。ミクログリア除去：PLX5622 (CSF1 阻害剤入りの餌、1200 ppm, Plexxikon 社) を 2 週間負荷し、ミクログリアを除去した。マクロファージ除去：12.5 mg/kg クロドロン酸リポソームを腹腔投与し、末梢マクロファージを除去した。好中球除去：anti-Gr1 (200 µg) を腹腔投与し末梢好中球を除去した。

・ DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルマウスにおける皮膚症状および自発のひっかき行動の評価

C57BL/6J マウスに PLX5622 もしくは AIN (コントロール食) を 2 週間負荷した後、DNFB による接触性皮膚炎を誘導した。ひっかき行動実験用アリーナ (15 cm x 15 cm x 40 cm) にマウスをいれ、皮膚炎領域の自発的なひっかき行動をビデオカメラで撮影した。5 min おきのマウスのひっかき行動をカウントし、合計 30 min のひっかき回数を計算した。併せて、背中の写真撮影を行い、皮膚サンプルを採取し皮膚症状を評価した。

#### 4 研究の成果

・末梢炎症時におけるミクログリア由来の GFP 陽性 MV の検出

Iba1-GFP マウスに LPS を腹腔投与した後、*in vivo* イメージングを行ったところ、脳血管内に 2 種類の GFP 陽性の小胞 (大型:約 10  $\mu\text{m}$ /小型:約 1  $\mu\text{m}$ ) を認めた (図 3)。大型 GFP 陽性小胞は、LPS 投与後、1 日目に多く観察

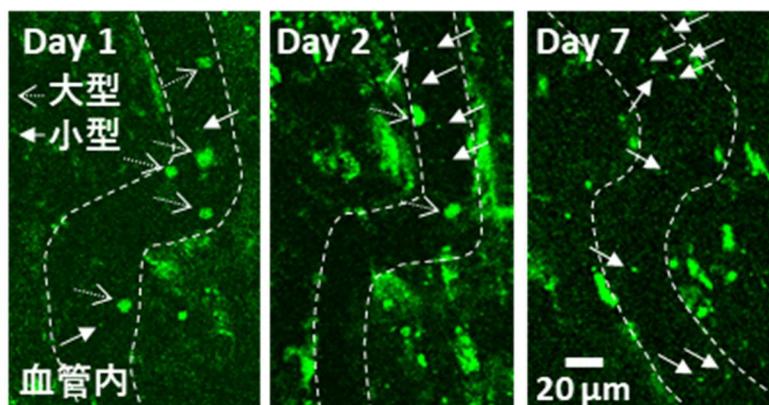


図 3. LPS 誘導性の大型および小型 GFP 陽性小胞の観察

され、2 日目以降に一気に消失した。一方、小型 GFP 陽性小胞は、2 日目に最大となり、7 日目も認められ、14 日目に消失した。

Iba1 はミクログリア以外に、末梢のマクローファージや一部好中球に発現していることが報告されている。そこで、クロドロン酸含有リポソーム (末梢の単球・マクローファージ除去) もしくは anti-Gr1 抗体 (血中の好中球除去) をあらかじめ Iba1-GFP マウスに投与した後、LPS 誘導性 GFP 陽性小胞が観察されるか検討した。末梢の単球・マクローファージを除去すると、大型 GFP 陽性小胞は消失したが、小型 GFP 陽性小胞は変わらず観察された (図 4)。また、好中球を除去しても、大型及び小型 GFP 陽性小胞は同様に観察された (図 4)。これらのことから、小型 GFP 陽性小胞は少なくとも、末梢の Iba1 陽性免疫細胞由来ではないと考えられた。

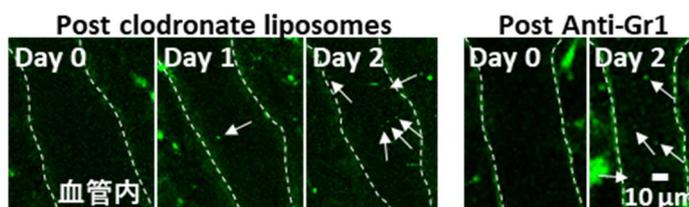


図 4. 末梢単球・マクローファージもしくは好中球除去後の LPS 誘導性小型 GFP 陽性小胞の観察

続いてミクログリアを可視化できる他のライン (CX3CR1-GFP マウス) を用い、同様の実験を行ったところ、本マウスにおいても約 1  $\mu\text{m}$  弱の小型 GFP 陽性小胞を観察した。さらに LPS 誘導性の小型 GFP 陽性小胞は PLX 5622 (CSF1R 阻害剤) 負荷によりミクログリアを除去したマウスでは観察されなかった (図 5)。これらの実験結果か

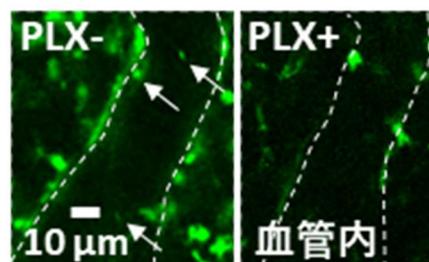


図 5. LPS 誘導性の小型 GFP 陽性小胞に対するミクログリア除去の影響

ら、LPS による末梢炎症を感知したミクログリアが MV に相当する EV を放出し、これが血管を介して末梢に輸送されていることが示唆された。

・DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルにおけるミクログリア由来の GFP 陽性 MV の検出

Iba1-GFP マウスにイミキモド誘導性乾癬もしくは DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルを適応し、*in vivo* イメージングで小型 GFP 陽性小胞が検出できるかを観察した。その結果、接触性皮膚炎モデルマウスにおいて、小型 GFP 陽性

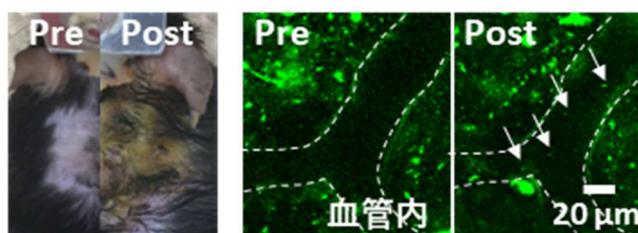


図 6. 接触性皮膚炎モデルマウスにおける小型 GFP 陽性小胞の観察

小胞が血中に認められた (図 6)。LPS による全身性の炎症のみならず、接触性皮膚炎モデルにおいても小型 GFP 陽性小胞が認められたことから、ミクログリアの MV 放出は一部末梢炎症に共通した現象であり、ミクログリアはこの MV により末梢炎症を制御している可能性が示唆された。

・DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルの自発ひっかき行動におけるミクログリアの影響

C57BL/6J マウスに PLX5622 を 2 週間負荷しミクログリアを除去した後、DNFB による接触性皮膚炎を引き起こしたところ、コントロール群 (AIN 負荷群) と比較し、ミクログリア除去による皮膚炎に対する顕著な影響は認められなかった (図 7)。一方で、自発のひっかき行動に対しては、ミクログリア除去群で、減少傾向が認められた。従って、ミクログリアは、接触性皮膚炎モデルにおいて皮膚の炎症には関与しない一方で、本モデルの痒みには関与していることが示唆された。

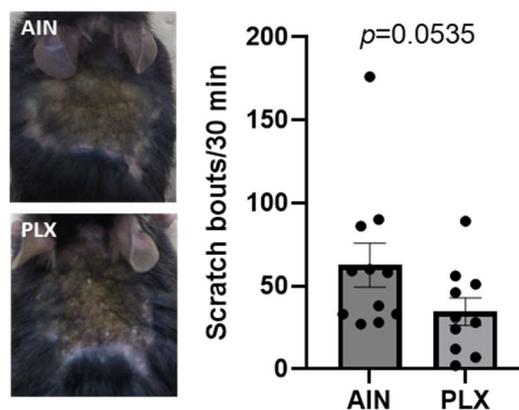


図 7. ミクログリア除去による皮膚症状およびひっかき行動に対する影響

## 5 今後の展望

本研究により、ミクログリアが LPS 投与や DNFB 塗布による接触性皮膚炎モデルといった一部末梢炎症に対し、MV を放出することで末梢炎症に応答

するメカニズムが存在することが示唆された。さらに、ミクログリア除去により DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルの痒みが抑制されたことから、ミクログリアが痒みの経路に何らかの影響を与えていることが示唆された。

今後は、ミクログリア由来 MV が皮膚炎症部位に到達しているか、また痒み抑制効果を有するかを明らかにするため、ミクログリア由来 MV のトレーサー実験および皮膚へ投与時のひっかき行動実験を行う。トレーサー実験：Iba1-GFP もしくは CX3CR1-GFP マウスに DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルを適応し、遠心機を用いて血漿中の小型 GFP 陽性小胞を単離する。これを、接触性皮膚炎モデルを適応した C57BL6/J マウスに投与 (i.v.) した後、炎症及び非炎症部位の皮膚を採取し、GFP 陽性 MV が皮膚に到達したかを評価する。ひっかき行動実験：単離された GFP 陽性 MV を DNFB 誘導性接触性皮膚炎部位に投与し、痒みの抑制効果があるか検討する。

また、皮膚炎におけるアレルギー疾患で最も多い疾患はアトピー性皮膚炎のため、将来的にはアトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるミクログリアの MV の影響を評価したい。本研究を通して、山梨県が力を入れている「10 難病などの疾病対策の推進 (特にアレルギー疾患対策の推進)」に貢献していきたい。

## 6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

申請者がこれまで行ってきた通り、英語論文・学会発表という形で研究成果を積極的に世界に発信していく。加えて、山梨 GLIA センターの HP において、日本語だけでなく英語での情報発信・業績報告も行っていく。

また、下記 1 の学会発表を既に行っており、2024 年には下記 2 の学会発表を予定している。

- 1 : 第 96 回日本薬理学会 (2022 年)、一般口頭、3-B-O07-3、抹消の急性および慢性炎症モデルマウスにおけるミクログリア由来のマイクロベシクル分泌の観察、坂井 謙斗<sup>1</sup>、小泉修一<sup>1、2</sup>、<sup>1</sup>山梨大 院医 山梨 GLIA センター、<sup>2</sup>山梨大 院医 薬理
- 2 : NEURO2024 (2024 年)、一般ポスター (予定)、LPS による末梢炎症および接触性皮膚炎モデルにおけるミクログリアのマイクロベシクル放出、坂井 謙斗<sup>1</sup>、小泉修一<sup>1、2</sup>、<sup>1</sup>山梨大 院医 山梨 GLIA センター、<sup>2</sup>山梨大 院医 薬理